

51

Int. Cl.:

C 07 c, 103/52

C 07 g, 7/00

C 07 g, 15/00

A 61 k, 27/00

(079-7/00-C

48

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DEUTSCHES



u. Lizenzabteilung K 801

PATENTAMT

52

Eing. 0 4. DEZ. 1997

Deutsche Kl.:

12 q, 6/01

12 p, 16

30 h, 2/36

A 61 K 37/26

12p16

☐ WV.☐ ablegen☐ Vert. wie Vorg. / angegeg.

10

11

# Offenlegungsschrift 2 219 635

21

Aktenzeichen: P 22 19 635.6

22

Anmeldetag: 21. April 1972

43

Offenlegungstag: 9. November 1972

Ausstellungspriorität: —

30

Unionspriorität

32

Datum: 30. April 1971

33

Land: V. St. v. Amerika

31

Aktenzeichen: 139120

54

Bezeichnung: Insulinprodukt

61

Zusatz zu: —

62

Ausscheidung aus: —

71

Anmelder: Eli Lilly and Co., Indianapolis, Ind. (V. St. A.)

Vertreter gem. § 16 PatG: Maas, J., Dipl.-Chem. Dr.;  
Voithenleiter, F., Dipl.-Chem. Dr. rer. nat.; Patentanwälte,  
8000 München

72

Als Erfinder benannt: Jackson, Richard Lee, Indianapolis, Ind. (V. St. A.)

DT 2219635

PATENTANWÄLTE  
DR. I. MAAS  
DR. F. VOITHENLEITNER  
8 MÜNCHEN 40  
SCHLEISSHEIMER STR. 299 - TEL. 3592201/205

X-3442

Eli Lilly and Company, Indianapolis, Indiana, V.St.A.

Insulinprodukt

Die Erfindung bezieht sich auf einen Insulinsalz-Protamin-Komplex und eine Suspension davon in einem wässrigen Medium sowie auf ein Verfahren zur Herstellung des Komplexes und der Suspension.

Gegenstand der Erfindung ist ein Insulinsalz-Protamin-Komplex, der ein Alkali- oder Ammoniumsalz von Insulin und 0,2 mg bis 1,5 mg Protamin je 100 Einheiten Insulin enthält.

Die Erfindung betrifft ferner eine Suspension aus Wasser oder einer isotonischen Lösung, die den Insulinsalz-Protamin-Komplex suspendiert enthält. Der Komplex ist in einer Menge suspendiert, die 90 bis 115 Einheiten Insulin pro 100 ml Suspension ergibt.

Der Insulinsalz-Protamin-Komplex wird hergestellt, indem

(A) in einem wässrigen Medium

- 1) Protamin und
- 2) ein Alkali- oder Ammoniumsalz von Insulin

209846/1250

(B) in solchen Verhältnissen vereinigt werden, daß je 100 Einheiten Insulin 0,2 bis 1,5 mg Protamin vorhanden sind und

(C) dadurch eine Suspension eines unlöslichen Komplexes erzeugt wird.

Gegenwärtig verfügbare Insulinpräparate werden gewöhnlich in bezug auf ihre biologische Aktivität in solche mit kurzer, mittlerer oder länger anhaltender Wirkung eingeteilt. In vielen Diabetesfällen ist ein wünschenswertes Präparat zur therapeutischen Anwendung eines mit einem raschen Einsetzen der Wirkung und anhaltenden Dauer der Wirkung. Eine solche doppelte Wirkung zur wirksamen Bekämpfung von Hyperglycämie unter Verwendung einer einzigen Injektion hat keines der im Handel erhältlichen Insulinpräparate gezeigt.

Obwohl in den letzten Jahren ein vorgemischtes Insulinpräparat, das sowohl die gewünschte kurze als auch die mittlere hypoglycämische Aktivität hat, auf den Markt gebracht wurde, erfordert das Präparat noch bestimmte Lagerungsbedingungen und eine Konservierung und ist daher verbesserungsbedürftig. Die vorgemischte Zusammensetzung besteht aus einer Lösung von Zinkinsulinkristallen, die aus Schweinepancreas stammen, und einer Suspension von Zink-Rinderinsulin-Kristallen mit hohem Zinkgehalt. Bei anderen früheren Präparaten, bei denen Lösungen von Zinkinsulinkristallen oder amorphem Insulin mit Protamin-Zink-Insulin oder Protamin-Insulin-Präparaten vermischt wurden, traten Stabilitätsprobleme infolge Abbau von Protamin und auch Fällung der löslichen Insulinkomponente durch überschüssiges Protamin in der Mischung auf. Viele Schwierigkeiten, zum Beispiel niedere Reinheit, Unbeständigkeit,

schlechte Farbe, Verunreinigung durch den hyperglycämischen Faktor (Glucagon) und antigene Proteine mit hohem Molekulargewicht, die in Verbindung mit handelsüblichen Zinkinsulinkristallen auftreten, sind nun durch Entwicklung von Zusammensetzungen, die sowohl eine rasch einsetzende als auch langanhaltende hypoglycämische Wirkung haben, behoben worden.

Ein Vorteil der Erfindung liegt darin, daß sie eine Einzelinjektionsinsulinsuspension bietet, die beim Gebrauch ein rasches Einsetzen der Wirkung und eine verlängerte Dauer der Wirkung ergibt.

Ein weiterer Vorteil liegt darin, daß der Insulinkomplex oder die Suspension lange Zeitdauer ohne wesentliche Verschlechterung gelagert werden können.

Die beigefügten Figuren 1, 2, 3, 4 und 5 sind Diagramme, in denen die Blutzuckerwerte dargestellt sind, die sich nach Injektion von verschiedenen Insulinpräparaten bei Tieren ergeben. Die Zeit ist auf der Abszisse und der Blutzuckerspiegel des Tieres, das die Injektion erhält, auf der Ordinate aufgetragen.

Fig. 1 ist ein Diagramm, das die Wirkung der Injektion von Protamin-Natriuminsulin im Vergleich zu Isophaninsulin (NPH) zeigt.

Fig. 2 ist ein Diagramm, das die Wirkung des Komplexes oder der Suspension nach der Erfindung im Vergleich zu der Wirkung einer Mischung aus saurem regulärem Insulin und Isophaninsulin zeigt.

Fig. 3 ist ein Diagramm, das drei Suspensionen nach der Erfindung, nämlich Rinderinsulin, Schweineinsulin, und eine Mischung der beiden, vergleicht.

Fig. 4 ist ein Diagramm, das die Aktivitäten des erfindungsgemäßen Komplexes nach Lagerung vergleicht.

Fig. 5 ist ein Diagramm, das beispielhafte Komplexe und Suspensionen nach der Erfindung vergleicht.

Der nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erzeugte Insulinsalz-Protamin-Komplex ist als Wirkstoff in einem hypoglycämischen Mittel vorteilhaft, das sowohl eine rasch einsetzende als auch eine langanhaltende Wirkung hat. Das Insulinsalz ist ein Alkalisalz oder Ammoniumsalz und das Protamin liegt vorzugsweise als Sulfat in Verhältnissen von etwa 0,2 mg bis etwa 1,5 mg und vorzugsweise etwa 0,4 bis etwa 0,8 mg je 100 Einheiten Insulin vor.

Das Insulinsalz, das praktisch frei von Zink und anderen Schwermetallen ist, wird vorzugsweise durch alkalische Kristallisation des Insulins unter Verwendung von Natriumhydroxid, eines anderen Alkalihydroxids oder Ammoniumhydroxid hergestellt. Nach der Kristallisation werden die Kristalle gewaschen und auf einen Feuchtigkeitsgehalt von weniger als 10 % getrocknet. Das Insulinsalz ist in Wasser bei neutralem pH-Wert sofort löslich und kann in Lösung so lange Zeit wie 3 Monate ohne wesentliche Verschlechterung gelagert werden.

Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren werden das oben beschriebene Insulinsalz und Protamin in einem wässrigen Medium in solcher Weise vereinigt, daß sich ein Komplex aus dem Insulinsalz und Protamin bildet. Das wässrige Medium hat einen pH-Wert von 6,5 bis 8,0. Der Protamin-Insulinsalz-Komplex kann von dem flüssigen Medium leicht durch Filtration oder ähnliche Maßnahmen abgetrennt und getrocknet werden. Der Komplex kann in trockener Form mindestens 1 Jahr und länger ohne



Verschlechterung gelagert werden. Wenn der Protamin-Insulinsalz-Komplex zur Anwendung kommen soll, wird das getrocknete Material in einem wässrigen Medium, vorzugsweise einem isotonischen Verdünnungsmittel, mit einem pH-Wert von etwa 6,5 bis etwa 8,0 rekonstituiert. Nach der Rekonstitution ist der Komplex injektionsfertig. Bei dem Patienten, der das rekonstituierte Präparat erhält, zeigt sich sowohl ein rasches Einsetzen der Wirkung als auch eine längere Dauer der hypoglycämischen Aktivität.

Nach einer typischen Methode zur Herstellung des Protamin-Insulinsalz-Komplexes wird das Natriumsalz von Insulin so hergestellt, daß das Natriuminsulin praktisch zinkfrei ist, d.h. weniger als etwa 0,05 % Zink enthält. Das Natriumsalz hat kristalline Form, ist jedoch in Wasser oder einem isotonischen Verdünnungsmittel löslich. Das Natriumsalz wird dann in dem flüssigen Medium in solchem Verhältnis gelöst, daß 90 bis etwa 115 Einheiten pro 100 ml flüssiges Medium vorliegen. Dann wird das flüssige Medium mit der richtigen Menge Protaminsulfat versetzt. Es entsteht sofort ein unlöslicher Komplex in Form eines sehr feinen Niederschlags. Der feinteilige Niederschlag bleibt in dem flüssigen Medium ziemlich gut suspendiert und eignet sich für eine leichte Injektion durch den Verbraucher. Wenn der Komplex in dem flüssigen Medium gelagert wird, bleibt er stabil und zeigt für Zeiten von mindestens einem Jahr keinen Aktivitätsverlust.

Wenn getrockneter Protamin-Insulinsalz-Komplex rekonstituiert wird, ist es zweckmäßig, den Komplex in die Flüssigkeit einzumischen, um den Niederschlag in dem flüssigen Medium zum Zweck der Injektion zu verteilen.

Die genaue Art der Assoziation zwischen dem Insulinsalz und dem Protamin ist nicht bekannt. Die Assoziation ist jedoch genügend fest, so daß sich der unlösliche Komplex leicht von dem flüssigen Medium abtrennen und zur leichteren Verfrachtung oder für sehr lange Lagerzeiten trocknen läßt. In trockener Form kann das Produkt unbegrenzte Zeit gelagert werden.

Zunächst wurde angenommen, daß das rasche Einsetzen der Wirkung, das bei dem Protamin-Insulinsalz-Präparat beobachtet wird, durch freies Insulin in der Mutterlauge bedingt ist. Die Analyse hat jedoch gezeigt, daß nur 0,015 % der gesamten Insulinaktivität des Präparats in der löslichen Form verbleiben. Es scheint daher, daß die Assoziation des Insulins mit dem Protamin ziemlich locker ist und das Insulin daher leicht für die Absorption nach der Injektion verfügbar ist. Es hat ferner den Anschein, daß die Natur des Komplexes von den bekannten handelsüblichen Protamin-Zink-Insulinprodukten verschieden ist, bei denen die Dissoziation des Insulins aus dem Komplex in den Geweben wesentlich langsamer stattfindet und kein rasches Einsetzen der Wirkung beobachtet wird.

Der Protamin-Insulinsalz-Komplex wird in einem flüssigen Medium mit einem pH-Wert von etwa 6,5 bis etwa 8,0 und vorzugsweise etwa 7,2 bis etwa 7,6 erzeugt.

Das benötigte Alkalimetallsalz von Insulin wird erhalten, indem man rohes Insulin einer Behandlung in Gegenwart von Alkalimetallionen zur Kristallisation des Insulins als Alkalisalz unterwirft. Aus Gründen der Wirtschaftlichkeit und eines einfachen Betriebs wird Natriumhydroxid als Quelle für Alkalimetallionen, die zur Erzeugung des Alkalisalzes von Insulin verwendet werden, bevorzugt. Das Natriumsalz wird hergestellt, indem man

rohes Insulin in wässriger Lösung einer Behandlung mit Natriumhydroxid, das in genügender Menge vorhanden ist, um einen pH-Wert von etwa 8 bis 8,5 zu ergeben, unterwirft. Die Behandlung besteht darin, daß die alkalische Lösung wenigstens 15 Minuten und vorzugsweise etwa 1 Stunde oder mehr gelinde gerührt wird. Das Natriuminsulinsalz scheidet sich in der Lösung ab und läßt sich leicht durch Dekantieren, Zentrifugieren, Filtrieren oder dergleichen abtrennen. Das Natriuminsulinsalz kann durch anschließendes Auflösen des Salzes und erneute Erzeugung des Niederschlags, der kristallin aussieht, gereinigt werden. Die Analyse hat gezeigt, daß im Fall des Natriumsalzes von Insulin etwa 1 Mol Natrium pro Mol Insulin vorliegt. Die Natriuminsulinkristalle können von Rinder- oder Schweine-Insulin stammen und sind in Wasser und isotonischen Lösungen bei pH-Werten um den Neutralpunkt sehr gut löslich.

Geeignete Alkali- oder Metalloidionen, mit denen das Insulinsalz hergestellt werden kann, sind beispielsweise Kalium-, Lithium-, Cäsium-, Natrium- und Ammoniumionen.

Das Protamin liegt im allgemeinen in Form von Protaminsulfat vor oder kann in anderen geeigneten wasserlöslichen Formen verwendet werden. Falls ein isotonisches Verdünnungsmittel als flüssiges Medium für das Protaminsulfat und Insulinsalz verwendet wird, enthält das Verdünnungsmittel vorzugsweise ein Konservierungsmittel. Geeignete Konservierungsmittel sind beispielsweise Phenol und Methyl-p-hydroxybenzoat.

Die biologische Aktivität des Protamin-Insulin-Komplexes wurde an Kaninchen nach folgender Methode bestimmt:



36 Kaninchen wurden in zwei gleiche Gruppen aufgeteilt und 24 Stunden vor dem Test fasten gelassen. Während des Tests wurde Wasser sowie Futter vorenthalten. Aus der Ohrrendvene wurde zur ersten Blutzuckerbestimmung eine Blutprobe entnommen. Der Kaninchenkontrollgruppe wurde die vorgegebene Dosis des neutralen Protamin-Hagedorn-Insulins (NPH) injiziert. Der Testgruppe wurde der Protamin-Natriuminsulinkomplex (PSI) injiziert. In jedem der Tests betrug eine Einzeldosis 1,0 Einheiten/Kaninchen, was etwa 0,01 ccm des Insulinpräparats entsprach. Die ersten Blutproben wurden den Kaninchen jeweils nach einer 1/2 Stunde entnommen. Weitere Blutproben wurden 1,5, 3,0, 5,0, 7,0 und 9,0 Stunden nach der Injektion entnommen. Jede Blutprobe wurde auf den Blutzuckerspiegel analysiert und die Ergebnisse wurden in mg % Glucose angegeben. Für beide Gruppen wurde die mittlere Blutzuckerkonzentration bei jeder Blutprobenentnahmezeit berechnet.

In den Fällen, in denen ein Kreuz-Test angewandt wurde, wurde den Kaninchen, die die Kontrollprobe erhielten, der Protamin-Natriuminsulin-Komplex injiziert und umgekehrt. Diese Tests wurden eine Woche nach Beendigung der ursprünglichen Tests durchgeführt. Die Gesamtergebnisse sind als mittlere Blutzuckerkonzentration in mg % in Fig. 1 und in der folgenden Tabelle I dargestellt:

2219635

T a b e l l e I

Blutzuckerspiegel, mg %

<u>Zeit, Stunden</u>	<u>0</u>	<u>0,5</u>	<u>1,5</u>	<u>3,0</u>	<u>5,0</u>	<u>7,0</u>	<u>9,0</u>
Kontrolle (NPH)	83,8	64,9	43,3	41,3	64,6	67,4	69,8
PSI	80,1	51,1	36,9	36,1	51,1	60,6	70,9

Es ist zu ersehen, daß bei dem Protamin-Natriuminsulin-Komplex die Wirkung rascher einsetzt und länger anhält, als bei dem NPH-Produkt.

PSI (Protamin-Natriuminsulin) wurde mit einer Mischung aus ARI (saures reguläres Insulin) und NPH im Verhältnis 1 : 1, bezogen auf die Aktivität, verglichen. Die Protaminsulfatkonzentration betrug 0,8 mg/ml.

Bei diesem Test wurden 36 Kaninchen in einer Kreuzversuchsanordnung verwendet. Jedem Kaninchen wurden etwa 0,01 ml des Insulinprodukts injiziert, so daß es eine Einheit Insulin pro Injektion erhielt. Die Ergebnisse sind in Fig. 2 und in der folgenden Tabelle II dargestellt:

T a b e l l e II

Blutzuckerspiegel, mg %

<u>Zeit, Stunden</u>	<u>0</u>	<u>0,5</u>	<u>1,5</u>	<u>3,0</u>	<u>5,0</u>	<u>7,0</u>	<u>9,0</u>
ARI & NPH	88,0	45,9	34,2	43,5	71,6	84,2	88,6
PSI	87,2	59,3	47,1	45,2	51,9	58,0	64,3

209846/1250

Die vorstehenden Ergebnisse zeigen das rasche Einsetzen der Wirkung, das mit dem Protamin-Insulin-Komplex erzielt wird, sowie seine langanhaltende Wirkung.

Drei Typen von neutralen Protamin-Natriuminsulin-Produkten wurden in Kombination mit 0,02 mg Zink pro 100 Einheiten Insulin verglichen. Jedes der Insulinprodukte enthielt 0,02 mg Zink pro 100 Einheiten Insulin. Durch die Zugabe des Zinks sollte festgestellt werden, ob das Zink entweder das rasche Einsetzen der Wirkung oder die verlängerte Dauer der Wirkung, die mit dem Protamin-Natriuminsulin-Komplex erzielt wurden, beeinträchtigt. Wie aus den folgenden Angaben zu ersehen ist, wurde kein nachteiliges Ergebnis beobachtet.

Es wurden drei Produkte verglichen, nämlich Schweineinsulin, Rinderinsulin und eine Mischung, die 75 % Rinderinsulin und 25 % Schweineinsulin enthielt.

Jeder Test wurde an 6 Kaninchen mit einer Einzelinjektion von etwa 0,01 ml, die ungefähr eine Dosis von einer Einheit Insulin ergab, durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Fig. 3 und in der folgenden Tabelle III dargestellt:

T a b e l l e    I I I

Blutzuckerspiegel, mg %

<u>Zeit, Stunden</u>	<u>0</u>	<u>1,5</u>	<u>3,0</u>	<u>5,0</u>	<u>7,0</u>	<u>9,0</u>
Schwein	80,3	41,5	44,5	55,4	73,0	76,7
gemischt	80,2	40,5	37,6	53,1	60,7	65,6
Rind	85,5	42,6	35,3	38,5	53,4	63,0

Lösung wurde steril filtriert und dann in Phiolen in einer Menge von 1,0 ml pro Phiolen abgefüllt. Die Phiolen wurden einer Gefriertrocknung unter aseptischen Bedingungen unterworfen, wodurch in jeder Phiolen getrocknetes Natriuminsulin erhalten wurde. Das Insulin wurde in dieser Form bis zur Verwendung für Tests aufbewahrt.

In jede Phiolen wurde eine genügende Menge eines isotonischen Verdünnungsmittels injiziert, um das Insulin in einem wässrigen Medium so zu rekonstituieren, daß 101,3 Einheiten Insulin/ml flüssiges Medium vorlagen. Das isotonische Verdünnungsmittel enthielt 0,4 g Protaminsulfat/ml, 1,6 % Glycerin und 0,25 % Phenol (Gewicht/Volumen). Der pH-Wert des isotonischen Verdünnungsmittels betrug 7,4. Bei Zugabe der isotonischen Flüssigkeit zu dem getrockneten Natriuminsulin in der Phiolen fand augenblickliche Bildung des Protamin-Natriuminsulin-Komplexes statt. Dieser Komplex ließ sich in der Phiolen als sehr feinteiliger Niederschlag erkennen. Der Niederschlag blieb in dem wässrigen Verdünnungsmittel genügend gleichmäßig suspendiert, so daß beim Aufziehen in eine Injektionsspritze eine gleichmäßige Menge Insulin in jedem entnommenen Anteil vorlag.

#### B e i s p i e l 2

Dieses Beispiel erläutert die ausgezeichnete Stabilität des Protamin-Insulin-Komplexes. Das in diesem Beispiel verwendete neutrale PSI wurde wie in Beispiel 1 hergestellt, mit der Ausnahme, daß das isotonische Verdünnungsmittel 1,2 mg Protamin pro ml enthielt.

Jeder Test wurde an 9 Kaninchen durchgeführt. Die Zusammensetzung, nämlich der in dem isotonischen Verdünnungsmittel suspendierte Protamin-Natriuminsulin-Komplex wurde in dem Intervall zwischen den Tests bei 25 °C aufbewahrt. Wie vorher wurden den Kaninchen 0,01 ml des Insulinprodukts injiziert.

Die Ergebnisse sind in Fig. 4 und in der folgenden Tabelle IV dargestellt:

T a b e l l e IV

Blutzuckerspiegel, mg %

<u>Zeit,</u> <u>Stunden</u>	<u>0</u>	<u>1,5</u>	<u>3,0</u>	<u>5,0</u>	<u>7,0</u>	<u>9,0</u>
am Anfang	91,0	51,2	43,4	54,0	59,5	65,8
nach 1 Woche	84,1	49,3	43,2	48,4	52,1	61,2
nach 2 Wochen	78,3	45,0	33,5	37,6	48,9	54,6
nach 4 Wochen	95,3	40,9	29,8	36,6	45,7	55,8

Die Ergebnisse in Tabelle IV zeigen deutlich, daß selbst nach Lagerung der isotonischen Lösung, die den Protamin-Natriuminsulin-Komplex suspendiert enthält, bei 25 °C eine bemerkenswerte Stabilität der Insulinaktivität bezüglich der Erhaltung des raschen Einsetzens der Wirkung und der langanhaltenden Dauer der Wirkung festgestellt wird.



### Beispiel 3

Dieses Beispiel erläutert die Erzeugung und Verwendung des Protaminkomplexes von Ammoniuminsulin, Lithiuminsulin und Kaliuminsulin sowie des Natriuminsulins von Beispiel 1.

Jedes der genannten Insulinsalze wurde nach der Arbeitsweise von Beispiel 1 erzeugt, mit einer isotonischen Lösung, die 0,4 mg Protaminsulfat pro ml enthielt, vermischt und wie in Beispiel 1 18 Kaninchen injiziert. Die Ergebnisse sind in Fig. 5 und in der folgenden Tabelle V dargestellt.

Tabelle V

Blutzuckerspiegel, mg %

<u>Zeit, Stunden</u>	<u>0</u>	<u>1,5</u>	<u>3,0</u>	<u>5,0</u>	<u>7,0</u>	<u>9,0</u>
Ammonium	86,1	42,1	51,6	81,5	79,4	88,9
Lithium	87,1	38,6	38,6	60,2	75,9	81,1
Kalium	86,6	42,9	50,8	67,1	74,6	79,4
Natrium	80,1	36,9	36,1	51,1	60,6	70,9

Das Natriuminsulin zeigt zwar eine länger anhaltende Wirkung, jedes der anderen Mittel ergibt jedoch eine beträchtliche Senkung der Blutzuckerspiegel.

B e i s p i e l   4

Dieses Beispiel erläutert die Stabilität des Protamin-Natriuminsulin-Komplexes.

Der Komplex wurde wie in Beispiel 1 unter Verwendung von 0,4 mg/ml Protaminsulfat in dem isotonischen Verdünnungsmittel hergestellt. Nach Herstellung des Komplexes wurde der Komplex in mehrere Zentrifugenröhrchen gegeben. Dann wurde zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit abdekantiert. Der abgeschiedene Niederschlag wurde mit etwa 15 ml absolutem Alkohol und anschließend mit etwa 15 ml Äther gewaschen. Dann wurde der gewaschene Niederschlag bei Raumtemperatur im Vakuum getrocknet.

Das getrocknete Material wurde in einem neutralen isotonischen Verdünnungsmittel, wie es vorher beschrieben wurde, mit der Ausnahme, daß es kein Protaminsulfat enthielt, resuspendiert. Das resuspendierte Material wurde auf seine Aktivität analysiert und es wurde gefunden, daß die Aktivität von 88 bis 95 Einheiten/ml reichte, was einen geringen Verlust an Insulinmaterial zeigt, der beim Waschen des Protamin-Natriuminsulin-Komplexes vor dem Trocknen auftritt.

Die Tests wurden wie vorher an 9 Kaninchen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigt die folgende Tabelle VI. Der eine Test wurde mit Material durchgeführt, das in Wasser resuspendiert und dann gefriergetrocknet worden war.

T a b e l l e   V I

Blutzuckerspiegel, mg %

Zeit, Stunden	0	0,5	1,0	3,0	5,0	7,0	9,0
vakuum- getrocknet	82,0	52,5	57,3	67,8	76,7	74,3	77,3
gefrier- getrocknet	85,4	44,7	45,6	53,1	78,9	80,7	80,0

Jedes der getrockneten Insulinpräparate bewirkte nach Rekonstitution und Injektion eine beträchtliche Senkung der Blutzuckerspiegel.

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Insulinsalz-Protamin-Komplex, gekennzeichnet durch ein Alkali- oder Ammoniumsalz von Insulin und 0,2 mg bis 1,5 mg Protamin je 100 Einheiten Insulin.
2. Komplex nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Insulinsalz Natriuminsulinsalz ist.
3. Komplex nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Insulinsalz praktisch frei von Zink oder anderen Schwermetallen ist.
4. Komplex nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Feuchtigkeitsgehalt des Komplexes weniger als 10 % beträgt.
5. Suspension aus Wasser oder einer isotonischen Lösung, dadurch gekennzeichnet, daß darin der Komplex nach einem der Ansprüche 1 bis 4 in einer Menge suspendiert ist, die 90 bis 115 Einheiten Insulin pro 100 ml Suspension ergibt.
6. Suspension nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß der pH-Wert 6,5 bis 8,0 beträgt.

7. Verfahren zur Herstellung eines Insulinsalz-Protamin-Komplexes, dadurch gekennzeichnet, daß

(A) in einem wässrigen Medium

1) Protamin und

2) ein Alkali- oder Ammoniumsalz von Insulin

(B) in solchen Verhältnissen vereinigt werden, daß je 100 Einheiten Insulin 0,2 mg bis 1,5 mg Protamin vorliegen und

(C) dadurch eine Suspension eines unlöslichen Komplexes erzeugt wird.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß der pH-Wert 6,5 bis 8,0 beträgt.

9. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß das wässrige Medium eine isotonische Lösung ist.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Insulinsalz Natriuminsulinsalz ist.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Insulinsalz praktisch frei von Zink oder anderen Schwermetallen ist.



12. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß außerdem der unlösliche Komplex aus dem wässrigen Medium abgetrennt und der Feuchtigkeitsgehalt des Komplexes auf weniger als 10 % vermindert wird.

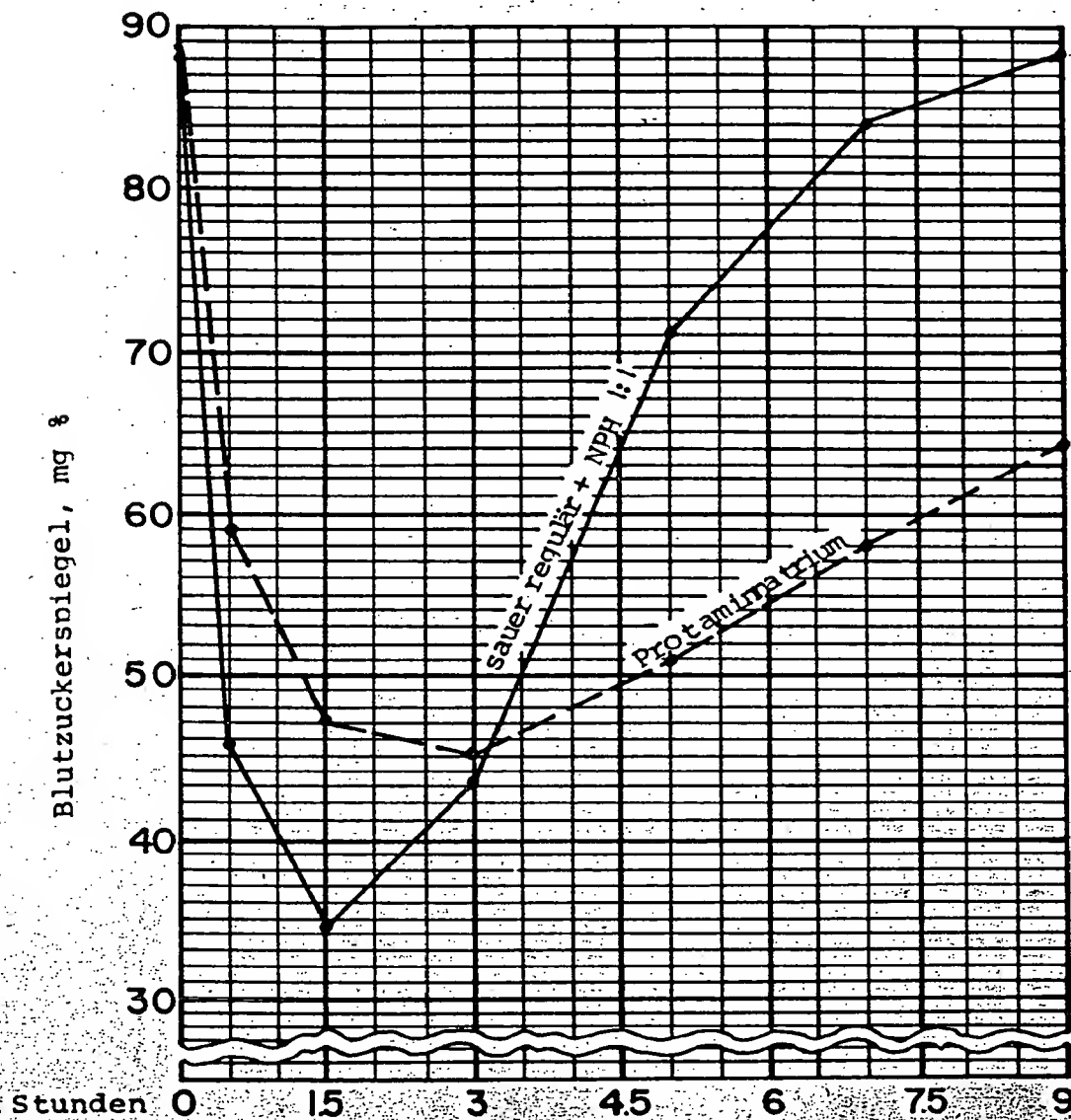


FIG. 2

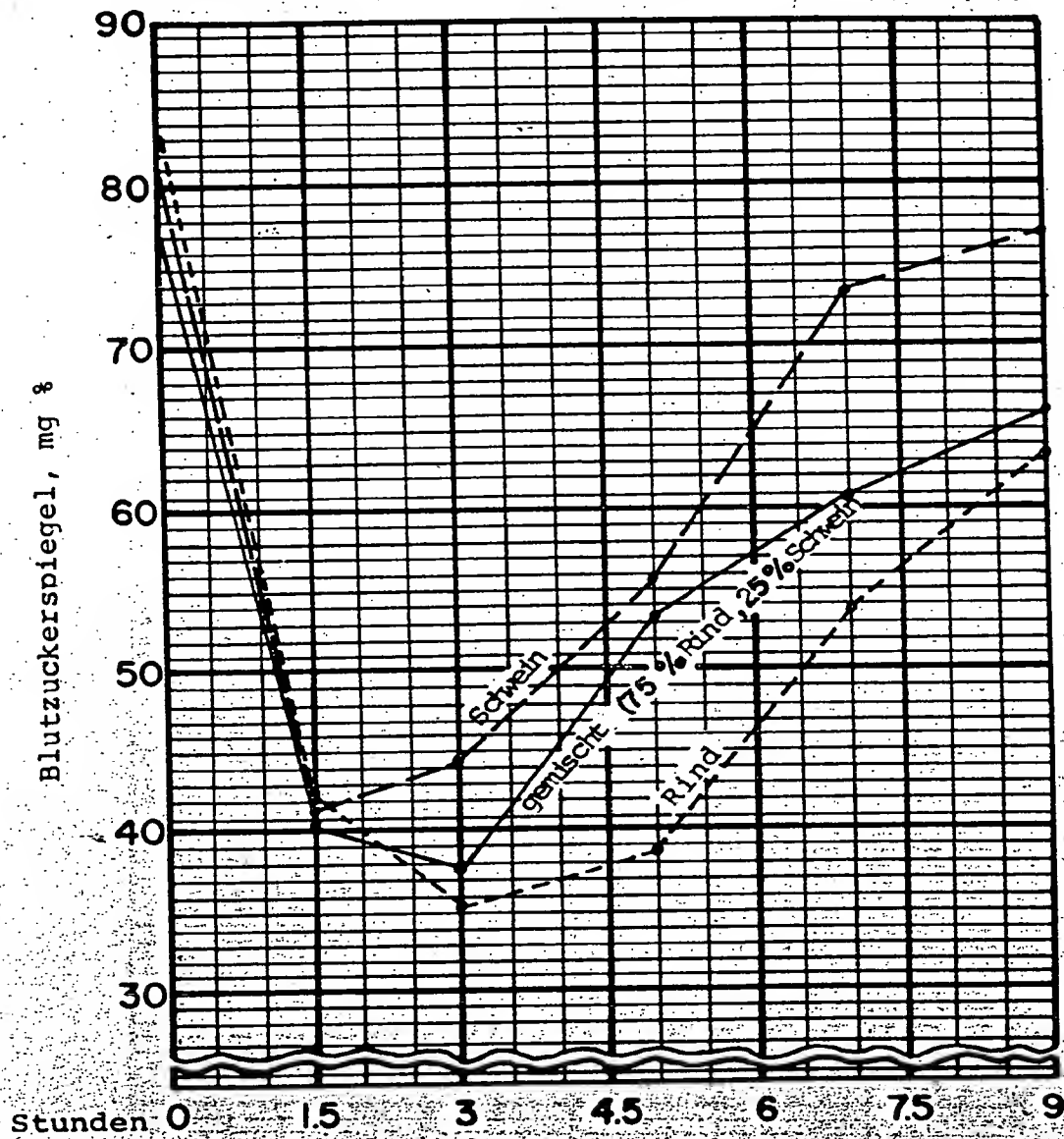


FIG. 3

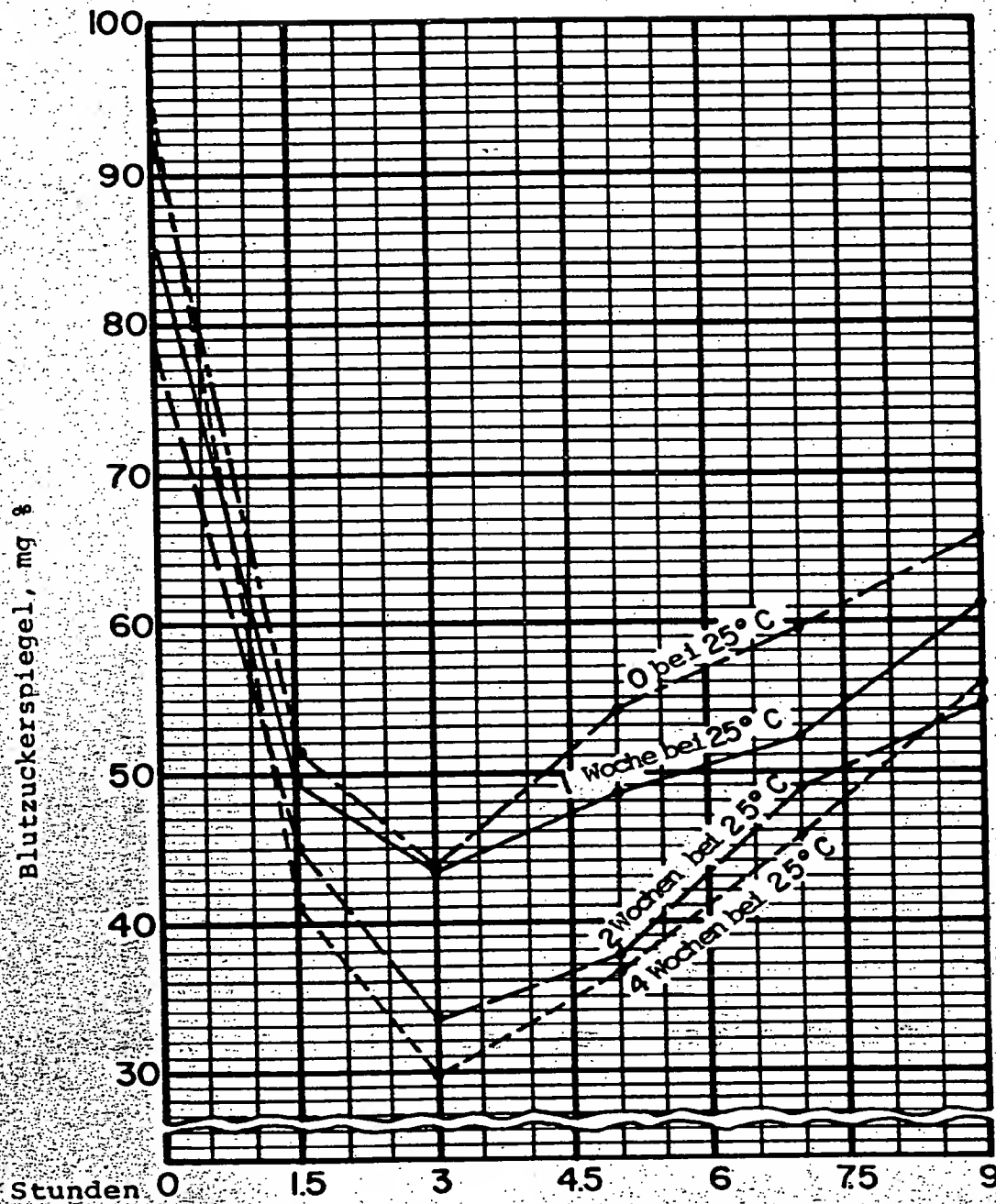


FIG. 4



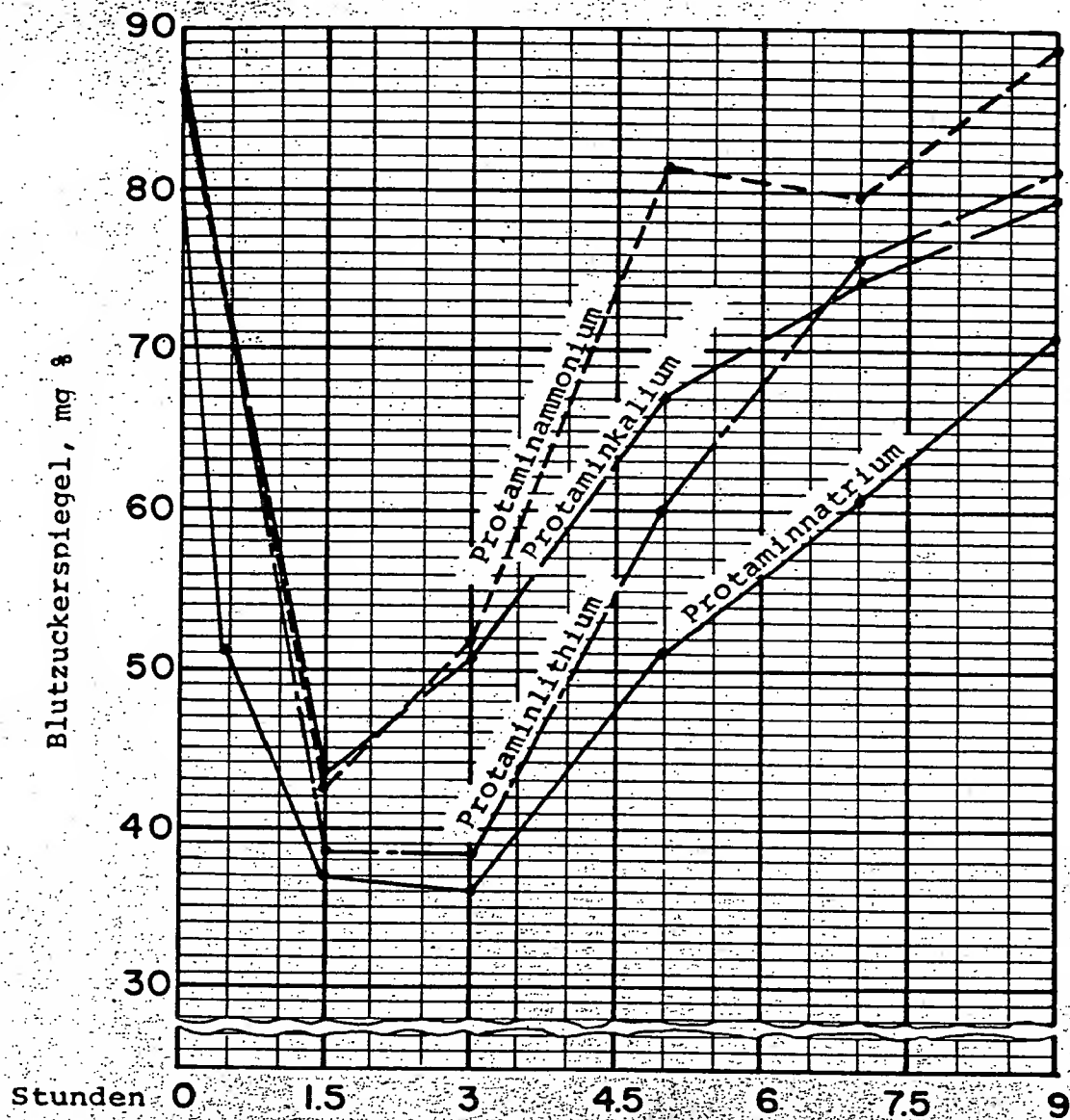


FIG. 5

209846/1250



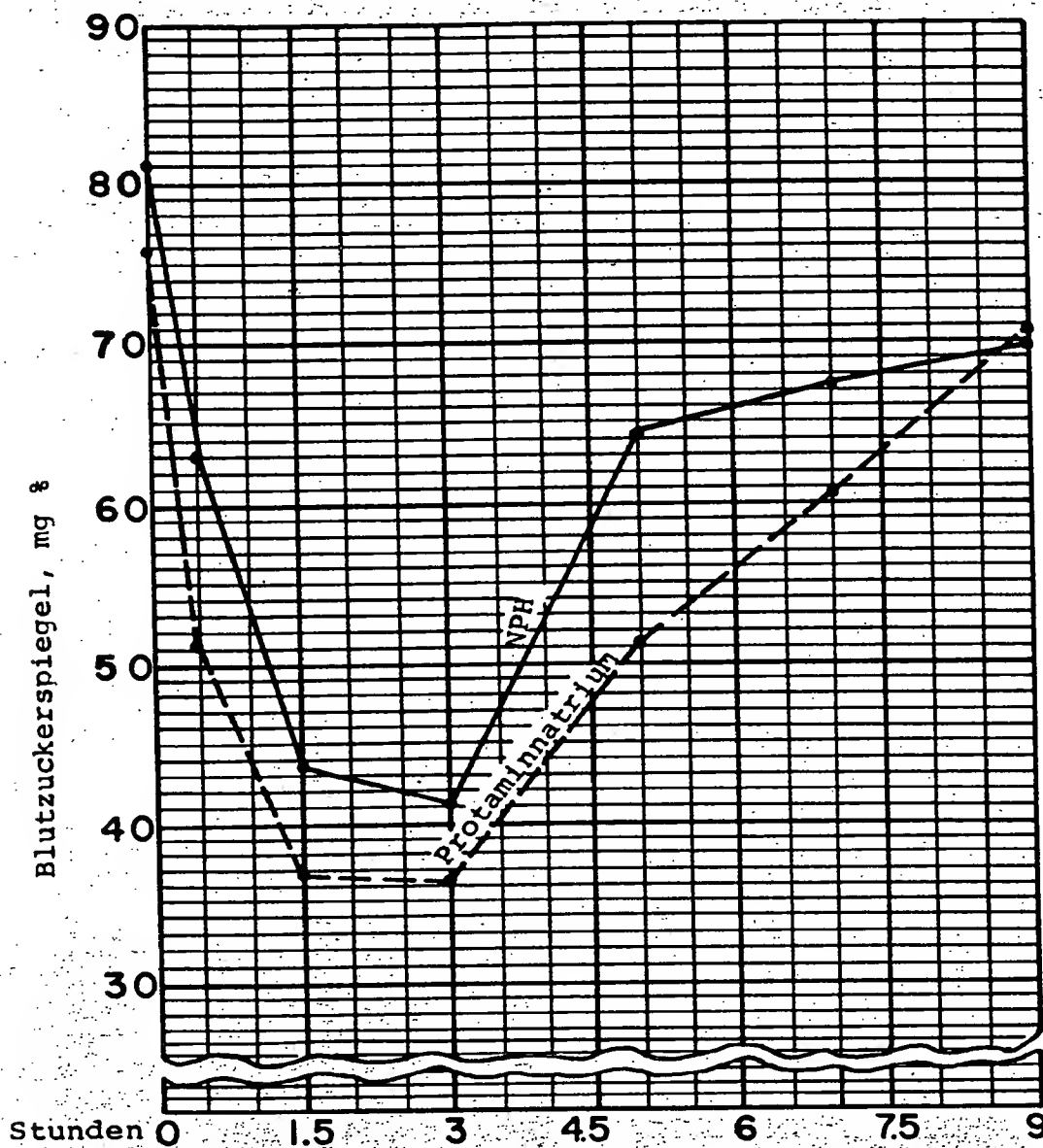


FIG. 1

209846/1250

# **This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

**Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.**

**Defects in the images include but are not limited to the items checked:**

- **BLACK BORDERS**
- **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ✕ **FADED TEXT OR DRAWING**
- **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- **REFERENCE (S) OR EXHIBIT (S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- **OTHER: \_\_\_\_\_.**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image problem Mailbox.**